

Attorney Docket :  
32301 WD 230

PATENT

1c971 U.S. PTO  
09/963790  
09/27/01

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

Applicant(s): Mike FARWICK, et al.

Serial No. : Unassigned

Group Art Unit : Unassigned

Filed: September 27, 2001

Examiner : Unassigned

For: NUCLEOTIDE SEQUENCES WHICH CODE FOR THE *dead* GENE

**CLAIM FOR FOREIGN PRIORITY**

Commissioner for Patents  
Washington, DC 20231

Sir:

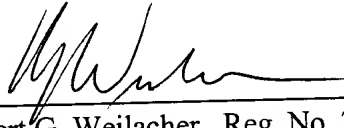
Under 35 U.S.C. §119, Applicants claim the benefit of the filing date of Patent Application 100 47 865.4 filed in **Germany** on **September 27, 2000**.

In support of this claim, a certified copy of the German priority application is attached hereto.

Respectfully submitted,

SMITH, GAMBRELL & RUSSELL, LLP

By :

  
Robert G. Weilacher, Reg. No. 20,531  
1850 M Street, NW - Suite 800  
Washington, DC 20036  
Telephone: (202) 659-2811  
Facsimile: (202) 263-4329

Date : September 27, 2001



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 100 47 865.4

**Anmeldetag:** 27. September 2000

**Anmelder/Inhaber:** Degussa AG, Düsseldorf/DE

**Erstanmelder:** Degussa-Hüls Aktiengesellschaft,  
Frankfurt am Main/DE

**Bezeichnung:** Neue für das deaD-Gen kodierende  
Nukleotidsequenzen

**IPC:** C 12 N, C 12 Q, C 07 H

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 02. August 2001  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
**Der Präsident**  
Im Auftrag

Jerofsky

### Neue für das deaD-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

Gegenstand der Erfindung sind für das deaD-Gen kodierende Nukleotidsequenzen aus coryneformen Bakterien und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren  
5 unter Verwendung von Bakterien, in denen das deaD-Gen abgeschwächt wird.

#### Stand der Technik

L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der  
10 Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung Anwendung.

Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere Corynebacterium glutamicum, hergestellt werden. Wegen der  
15 großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien, wie zum Beispiel die  
20 Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch zum Beispiel Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

25 Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und die  
30 Aminosäuren produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von L-

Aminosäure produzierenden Stämmen von Corynebacterium eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Aminosäure-Produktion untersucht.

## 5 Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren bereitzustellen.

### Beschreibung der Erfindung

- 10 Werden im folgenden L-Aminosäuren oder Aminosäuren erwähnt, sind damit eine oder mehrere Aminosäuren einschließlich ihrer Salze, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin gemeint. Besonders bevorzugt ist L-Lysin.

Wenn im folgenden L-Lysin oder Lysin erwähnt werden, sind damit nicht nur die Basen, sondern auch die Salze wie z.B. Lysin-Monohydrochlorid oder Lysin-Sulfat gemeint.

- 20 Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das dead-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- 25 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,

- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- 30

c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und

d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15  
5      aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz  
    von a), b) oder c),

wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität der DNA/RNA-Helikase aufweist.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das oben genannte Polynukleotid, wobei es sich bevorzugt um eine  
10 replizierbare DNA handelt, enthaltend:

(i)           die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No.1,  
          oder

(ii)          mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i)  
          innerhalb des Bereichs der Degeneration des  
15          genetischen Kodes entspricht, oder

(iii)         mindestens eine Sequenz, die mit den zu den  
          Sequenzen (i) oder (ii) komplementären Sequenzen  
          hybridisiert, und gegebenenfalls

(iv)          funktionsneutralen Sinnmutationen in (i).

20   Weitere Gegenstände sind:

ein replizierbares Polynukleotid, insbesondere DNA,  
    enthaltend die Nukleotidsequenz, wie in SEQ ID No.1  
    dargestellt;

ein Polynukleotid, das für ein Polypeptid  
25   kodiert, das die Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2  
    dargestellt, enthält;

ein Vektor, enthaltend Teile des erfindungsgemäßen  
    Polynukleotids, mindestens aber 15 aufeinanderfolgende  
    Nukleotide der beanspruchten Sequenz,

und coryneforme Bakterien, in denen das dead-Gen, insbesondere durch eine Insertion oder Deletion, abgeschwächt ist.

Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung einer entsprechenden Genbank eines coryneformen Bakteriums, die das vollständige Gen oder Teile davon enthält, mit einer Sonde, die die Sequenz des erfindungsgemäßen Polynukleotids gemäß SEQ ID No.1 oder ein Fragment davon enthält und Isolierung der genannten Polynukleotidsequenz.

Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung enthalten, sind als Hybridisierungssonden für RNA, cDNA und DNA geeignet, um Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene in voller Länge zu isolieren, die für die DNA/RNA-Helikase kodieren, oder um solche Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des dead-Gens aufweisen.

Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung enthalten, sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren Hilfe mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen hergestellt werden kann, die für die DNA/RNA-Helikase kodieren.

Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide enthalten mindestens 30, bevorzugt mindestens 20, ganz besonders bevorzugt mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 40 oder 50 Nukleotiden.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

„Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es

sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

Die Polynukleotide gemäß Erfindung schließen ein Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder ein daraus  
5 hergestelltes Fragment und auch solche ein, die zu wenigstens 70%, bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind mit dem Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder eines daraus hergestellten Fragments.

10 Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene Aminosäuren enthalten.

Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen ein Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2, insbesondere solche mit der  
15 biologischen Aktivität der DNA/RNA-Helikase und auch solche ein, die zu wenigstens 70%, bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 und die genannte Aktivität aufweisen.

20 Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin,  
25 L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits Aminosäuren produzieren und in denen die für das dead-Gen kodierenden Nukleotidsequenzen abgeschwächt, insbesondere ausgeschaltet oder auf niedrigem Niveau exprimiert werden.

30 Der Begriff „Abschwächung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die

entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise einen schwachen Promotor verwendet oder ein Gen bzw. Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer niedrigen Aktivität kodiert bzw. das entsprechende Gen oder  
5 Enzym (Protein) inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können Aminosäuren aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder  
10 aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung *Corynebacterium* handeln. Bei der Gattung *Corynebacterium* ist insbesondere die Art *Corynebacterium glutamicum* zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist,  
15 L-Aminosäuren zu produzieren.

Geeignete Stämme der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere der Art *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*), sind besonders die bekannten Wildtypstämme

*Corynebacterium glutamicum* ATCC13032  
20 *Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC15806  
*Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870  
*Corynebacterium melassecola* ATCC17965  
*Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539  
*Brevibacterium flavum* ATCC14067  
25 *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 und  
*Brevibacterium divaricatum* ATCC14020

und daraus hergestellte L-Aminosäuren produzierende Mutanten beziehungsweise Stämme.

Das neue, für das Enzym DNA/RNA-Helikase kodierende *deaD*-  
30 Gen von *C. glutamicum* wurde isoliert.

Zur Isolierung des *deaD*-Gens oder auch anderer Gene von *C. glutamicum* wird zunächst eine Genbank dieses Mikroorganismus in *Escherichia coli* (*E. coli*) angelegt. Das



- Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990), oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank ist die des E. coli K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495-508 (1987)) in  $\lambda$ -Vektoren angelegt wurde.
- 10 Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996) beschreiben eine Genbank von C. glutamicum ATCC13032, die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im E. coli K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 15 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde.
- Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326 (1992)) wiederum beschreiben eine Genbank von C. glutamicum ATCC13032 unter Verwendung des Cosmides pH79 (Hohn und Collins, 1980, Gene 11, 291-298).
- 20 Zur Herstellung einer Genbank von C. glutamicum in E. coli können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, 1979, Life Sciences, 25, 807-818) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 19:259-268) verwendet werden. Als Wirte eignen sich besonders solche E. coli-Stämme, die restriktions- und
- 25 rekombinationsdefekt sind wie beispielsweise der Stamm DH5 $\alpha$ mc<sup>r</sup>, der von Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde. Die mit Hilfe von Cosmiden oder anderen  $\lambda$ -Vektoren klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend
- 30 wiederum in gängige für die DNA-Sequenzierung geeignete Vektoren subkloniert und anschließend sequenziert werden, so wie es z. B. bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74:5463-5467, 1977) beschrieben ist.

Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z.B. dem von Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232(1986)), dem von Marck (Nucleic Acids Research 16, 1829-1836 (1988)) oder  
5 dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)) untersucht werden.

Die neue für das dead-Gen kodierende DNA-Sequenz von C. glutamicum wurde gefunden, die als SEQ ID No. 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurde aus der  
10 vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins abgeleitet. In SEQ ID No. 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des dead-Genproduktes dargestellt.

Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 1 durch  
15 die Degeneriertheit des genetischen Kodes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche  
20 wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ (sense mutations) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d.h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt,  
25 daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene  
30 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID No. 2 ergeben, sind  
35 ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren Bestandteil der Erfindung. Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich aus SEQ ID No. 1 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben typischerweise eine Länge von mindestens 15 Nukleotiden.

Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology 41: 255-260 (1991)). Die Hybridisierung findet unter stringenten Bedingungen statt, das heisst, es werden nur Hybride gebildet, bei denen Sonde und Zielsequenz, d. h. die mit der Sonde behandelten Polynukleotide, mindestens 70% identisch sind. Es ist bekannt, dass die Stringenz der Hybridisierung einschließlich der Waschschriffe durch Variieren der Pufferzusammensetzung, der Temperatur und der Salzkonzentration beeinflusst bzw. bestimmt wird. Die Hybridisierungsreaktion wird vorzugsweise bei relativ niedriger Stringenz im Vergleich zu den Waschschriffen durchgeführt (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, UK, 1996).

Für die Hybridisierungsreaktion kann beispielsweise ein 5x SSC-Puffer bei einer Temperatur von ca. 50°C - 68°C eingesetzt werden. Dabei können Sonden auch mit Polynukleotiden hybridisieren, die weniger als 70% Identität zur Sequenz der Sonde aufweisen. Solche Hybride sind weniger stabil und werden durch Waschen unter stringenten Bedingungen entfernt. Dies kann beispielsweise durch Senken der Salzkonzentration auf 2x SSC und gegebenenfalls nachfolgend 0,5x SSC (The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim,

Mannheim, Deutschland, 1995) erreicht werden, wobei eine Temperatur von ca. 50°C - 68°C eingestellt wird. Es ist gegebenenfalls möglich die Salzkonzentration bis auf 0,1x SSC zu senken. Durch schrittweise Erhöhung der

5 Hybridisierungstemperatur in Schritten von ca. 1 - 2°C von 50°C auf 68°C können Polynukleotidfragmente isoliert werden, die beispielsweise mindestens 70% oder mindestens 80% oder mindestens 90% bis 95% Identität zur Sequenz der

10 eingesetzten Sonde besitzen. Weitere Anleitungen zur Hybridisierung sind in Form sogenannter Kits am Markt erhältlich (z.B. DIG Easy Hyb von der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Catalog No. 1603558).

Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe

15 der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

20 Es wurde gefunden, daß coryneforme Bakterien nach Abschwächung des deadD-Gens in verbesserter Weise Aminosäuren produzieren.

Zur Erzielung einer Abschwächung können entweder die Expression des deadD-Gens oder die katalytischen

25 Eigenschaften des Enzymproteins herabgesetzt oder ausgeschaltet werden. Gegebenenfalls können beide Maßnahmen kombiniert werden.

Die Verringerung der Genexpression kann durch geeignete Kulturführung oder durch genetische Veränderung (Mutation)

30 der Signalstrukturen der Genexpression erfolgen. Signalstrukturen der Genexpression sind beispielsweise Repressorgene, Aktivatorgene, Operatoren, Promotoren, Attenuatoren, Ribosomenbindungsstellen, das Startkodon und Terminatoren. Angaben hierzu findet der Fachmann z.B. in

der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Boyd und Murphy (Journal of Bacteriology 170: 5949 (1988)), bei Voskuil und Chambliss (Nucleic Acids Research 26: 3548 (1998)), bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191 (1998)), bei Pátek et al. (Microbiology 142: 1297 (1996)), Vasicova et al. (Journal of Bacteriology 181: 6188 (1999)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem Lehrbuch von Knippers („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995) oder dem von Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990).

Mutationen, die zu einer Veränderung bzw. Herabsetzung der katalytischen Eigenschaften von Enzymproteinen führen, sind aus dem Stand der Technik bekannt; als Beispiele seien die Arbeiten von Qiu und Goodman (Journal of Biological Chemistry 272: 8611-8617 (1997)), Sugimoto et al. (Bioscience Biotechnology and Biochemistry 61: 1760-1762 (1997)) und Möckel („Die Threonindehydratase aus Corynebacterium glutamicum: Aufhebung der allosterischen Regulation und Struktur des Enzyms“, Berichte des Forschungszentrums Jülichs, Jül-2906, ISSN09442952, Jülich, Deutschland, 1994) genannt. Zusammenfassende Darstellungen können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

Als Mutationen kommen Transitionen, Transversionen, Insertionen und Deletionen in Betracht. In Abhängigkeit von der Wirkung des Aminosäureaustausches auf die Enzymaktivität wird von Fehlsinnmutationen („missense mutations“) oder Nichtsinnmutationen („nonsense mutations“) gesprochen. Insertionen oder Deletionen von mindestens einem Basenpaar (bp) in einem Gen führen zu Rasterverschiebungsmutationen („frame shift mutations“), in

deren Folge falsche Aminosäuren eingebaut werden oder die Translation vorzeitig abbricht. Deletionen von mehreren Kodonen führen typischerweise zu einem vollständigen Ausfall der Enzymaktivität. Anleitungen zur Erzeugung  
5 derartiger Mutationen gehören zum Stand der Technik und können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem Lehrbuch von Knippers („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995), dem von Winnacker („Gene und  
10 Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990) oder dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

Eine gebräuchliche Methode, Gene von *C. glutamicum* zu mutieren, ist die von Schwarzer und Pühler (Bio/Technology  
15 9, 84-87 (1991)) beschriebene Methode der Gen-Unterbrechung („gene disruption“) und des Gen-Austauschs („gene replacement“).

Bei der Methode der Gen-Unterbrechung wird ein zentraler Teil der Kodierregion des interessierenden Gens in einen  
20 Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise *E. coli*), nicht aber in *C. glutamicum* replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), pK18mobsacB oder  
25 pK19mobsacB (Jäger et al., Journal of Bacteriology 174: 5462-65 (1992)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). Journal of Biological Chemistry 269:32678-84; US-Patent 5,487,993), pCR®Blunt (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al.,  
30 Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)) oder pEM1 (Schrumpf et al, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zentrale Teil der Kodierregion des Gens enthält, wird anschließend durch Konjugation oder Transformation in den  
35 gewünschten Stamm von *C. glutamicum* überführt. Die Methode

der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994)) beschrieben. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivnan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben. Nach homologer Rekombination mittels eines "cross-over"-Ereignisses wird die Kodierregion des betreffenden Gens durch die Vektorsequenz unterbrochen und man erhält zwei unvollständige Allele, denen jeweils das 3'- bzw. das 5'-Ende fehlt. Diese Methode wurde beispielsweise von Fitzpatrick et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 42, 575-580 (1994)) zur Ausschaltung des recA-Gens von C. glutamicum verwendet.

Bei der Methode des Genaustausches („gene replacement“) wird eine Mutation wie z.B. eine Deletion, Insertion oder Basenaustausch in dem interessierenden Gen in-vitro hergestellt. Das hergestellte Allel wird wiederum in einen für C. glutamicum nicht replikativen Vektor kloniert und dieser anschließend durch Transformation oder Konjugation in den gewünschten Wirt von C. glutamicum überführt. Nach homologer Rekombination mittels eines ersten, Integration bewirkenden "cross-over"-Ereignisses und eines geeigneten zweiten, eine Exzision bewirkenden "cross-over"-Ereignisses im Zielgen bzw. in der Zielsequenz erreicht man den Einbau der Mutation bzw. des Allels. Diese Methode wurde beispielsweise von Peters-Wendisch et al. (Microbiology 144, 915 - 927 (1998)) verwendet, um das pyc-Gen von C. glutamicum durch eine Deletion auszuschalten.

In das deaD-Gen kann auf diese Weise eine Deletion, Insertion oder ein Basenaustausch eingebaut werden.

Zusätzlich kann es für die Produktion von L-Aminosäuren vorteilhaft sein, zusätzlich zur Abschwächung des deaD-Gens eines oder mehrere Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges,

der Glykolyse, der Anaplerotik, des Zitronensäure-Zyklus, des Pentosephosphat-Zyklus, des Aminosäure-Exports und gegebenenfalls regulatorische Proteine zu verstärken, insbesondere überzuexprimieren.

- 5 So kann für die Herstellung von L-Aminosäuren neben der Abschwächung des deadD-Gens gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
- das für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende Gen dapA (EP-B 0 197 335),
- 10
- das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase kodierende Gen gap (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
  - das für die Triosephosphat-Isomerase kodierende Gen tpi (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- 15
- das für die 3-Phosphoglycerat-Kinase kodierende Gen pgk (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
  - das für die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen zwf (JP-A-09224661),
- 20
- das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende Gen pyc (DE-A-198 31 609),
  - das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase kodierende Gen mqo (Molenaar et al., European Journal of Biochemistry 254, 395-403 (1998)),
- 25
- das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC (Accession No.P26512),
  - das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE (DE-A-195 48 222),
  - das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende Gen hom (EP-A 0131171),



- das für die Threonin-Dehydratase kodierende Gen *ilvA* (Möckel et al., Journal of Bacteriology (1992) 8065-8072)) oder das für eine "feed back resistente" Threonin-Dehydratase kodierende Allel *ilvA(Fbr)* (Möckel et al.,  
5 (1994) Molecular Microbiology 13: 833-842),
- das für die Acetohydroxysäure-Synthase kodierenden Gen *ilvBN* (EP-B 0356739),
- das für die Dihydroxysäuredehydratase kodierende Gen *ilvD* (Sahm und Eggeling (1999) Applied and Environmental  
10 Microbiology 65: 1973-1979),
- das für das Zwa1-Protein kodierende Gen *zwa1* (DE: 19959328.0, DSM 13115)

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren  
15 vorteilhaft sein, neben der Abschwächung des *deadD*-Gens gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen *pck* (DE 199 50 409.1, DSM 13047),
- 20 • das für die Glucose-6-Phosphat-Isomerase kodierende Gen *pgi* (US 09/396,478, DSM 12969),
- das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen *poxB* (DE:1995 1975.7, DSM 13114),
- das für das Zwa2-Protein kodierende Gen *zwa2* (DE:  
25 19959327.2, DSM 13113)

abzuschwächen, insbesondere die Expression zu verringern.

Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren vorteilhaft sein, neben der Abschwächung des deaD-Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: „Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms“, in: 5 Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung und können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren 10 (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von L-Aminosäuren kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden ist im Lehrbuch von Chmiel 15 (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

20 Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch „Manual of Methods for General Bacteriology“, der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 25 1981) enthalten.

Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette, wie zum Beispiel Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, 30 Fettsäuren, wie zum Beispiel Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie zum Beispiel Glycerin und Ethanol und organische Säuren, wie zum Beispiel Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten, wie zum Beispiel Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH - Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak beziehungsweise Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel, wie zum Beispiel Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe, wie zum Beispiel Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff-haltige Gasmischungen, wie zum Beispiel Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat.

Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Methoden zur Bestimmung von L-Aminosäuren sind aus dem Stand der Technik bekannt. Die Analyse kann zum Beispiel so  
5 wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben durch Anionenaustausch-Chromatographie mit anschließender Ninhydrin-Derivatisierung erfolgen, oder sie kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei  
10 Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174) beschrieben.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren.

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

15 Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Escherichia coli sowie alle Techniken zur Restriktion, Klenow- und alkalische Phosphatasebehandlung wurden nach Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA)  
20 durchgeführt. Methoden zur Transformation von Escherichia coli sind ebenfalls in diesem Handbuch beschrieben.

Die Zusammensetzung gängiger Nährmedien wie LB- oder TY-Medium kann ebenfalls dem Handbuch von Sambrook et al. entnommen werden.

#### 25 Beispiel 1

Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus C. glutamicum ATCC 13032

Chromosomale DNA aus C. glutamicum ATCC 13032 wurde wie bei Tauch et al., (1995, Plasmid 33:168-179) beschrieben,  
30 isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung

- Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250)
- 5 dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1 (Wahl et al. (1987), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1 Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem
- 10 Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02) gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase dephosphoryliert.

- Anschließend wurde die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym
- 15 BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten. Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,
- 20 Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no. 27-0870-04) behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschließend mit Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt.

- 25 Zur Infektion des E. coli Stammes NM554 (Raleigh et al. 1988, Nucleic Acid Res. 16:1563-1575) wurden die Zellen in 10 mM MgSO<sub>4</sub> aufgenommen und mit einem Aliquot der Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular
- 30 Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) + 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektioniert.

- 35 Beispiel 2

## Isolierung und Sequenzierung des Gens dead

- Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem
- 5 Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung
- 10 SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Isolierung der Cosmidfragmente im Größenbereich von 1500 bis 2000 bp mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany).
- 15 Die DNA des Sequenziervektors pZero-1 bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande, Produktbeschreibung Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01) wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Product
- 20 No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente in den Sequenziervektor pZero-1 wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses
- 25 Ligationsgemisch wurde anschließend in den E. coli Stamm DH5 $\alpha$ MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol. Letters, 123:343-7) und auf LB-
- 30 Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50  $\mu$ g/ml Zeocin ausplattiert.

- Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgte mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-
- 35 Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings

of the National Academies of Sciences, U.S.A., 74:5463-5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wurde der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der Sequenzierreaktion erfolgte in einem "Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377" Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland).

Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die Einzelsequenzen der pZerol-Derivate wurden zu einem zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte Kodierbereichsanalyse wurden mit dem Programm XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt. Weitere Analysen wurden mit den "BLAST search programs" (Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Research, 25:33893402) gegen die non-redundant Datenbank des "National Center for Biotechnology Information" (NCBI, Bethesda, MD, USA) durchgeführt.

Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1 dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergab ein offenes Leseraster von 1875 bp, welches als deaD-Gen bezeichnet wurde. Das deaD-Gen kodiert für ein Polypeptid von 624 Aminosäuren.

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; Degussa-Hüls AG

5 &lt;120&gt; Neue für das deaD-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

&lt;130&gt; 000557 BT

&lt;140&gt;

10 &lt;141&gt;

&lt;160&gt; 2

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

15

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 2381

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Corynebacterium glutamicum

20

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (259)..(2130)

&lt;223&gt; deaD-Gen

25

&lt;400&gt; 1

caggaaaccc cgcagggtga ctcagcatca gctgacttcg ctctcgaaac cccaaccaac 60

actgttgaag atgcaccagc atctgagggt agcgaagaga tcaccagggt tgcggataact 120

30

totgaggacg ccgactctgc agatgcagac aacgcgagca atgtaatcaa tgagaatgag 180

gactcctcgg aaggtgctaa ccagccttca aacgagtcac cctctacgga agccaaatcc 240

35

ggcttcgatg cactcgga ctg cca gag cgt gta ctt gac gct gtg cgc aag 291

Met Pro Glu Arg Val Leu Asp Ala Val Arg Lys  
1 5 10

gtg ggt tac gaa act cct tcc cca att cag gca caa acc atc cca atc 339

40

Val Gly Tyr Glu Thr Pro Ser Pro Ile Gln Ala Gln Thr Ile Pro Ile

15 20 25

ctc atg gag ggc cag gat gtt gtt ggt cta gca cag acc ggt acc ggt 387

45

Leu Met Glu Gly Gln Asp Val Val Gly Leu Ala Gln Thr Gly Thr Gly

30 35 40

aag act gca gct ttc gcg ctg cca atc ctt gcc cgt att gac aag tcc 435

Lys Thr Ala Ala Phe Ala Leu Pro Ile Leu Ala Arg Ile Asp Lys Ser

45 50 55

50

gtg cgc agc cca cag gca ctt gtg ctt gcc cct acc cgt gag cag gca 483

Val Arg Ser Pro Gln Ala Leu Val Leu Ala Pro Thr Arg Glu Gln Ala

60 65 70 75

55

ctt cag gtt gct gac tcc ttc caa tcc ttc gct gac cac gtc ggt ggc 531

Leu Gln Val Ala Asp Ser Phe Gln Ser Phe Ala Asp His Val Gly Gly

80 85 90

ctg aac gtt ctg cca atc tat ggt gga cag gct tac ggc att cag ctc 579



	Leu	Asn	Val	Leu	Pro	Ile	Tyr	Gly	Gly	Gln	Ala	Tyr	Gly	Ile	Gln	Leu	
				95					100					105			
5	tct	ggc	ctg	cgt	cgt	ggc	gct	cac	atc	gtc	gtg	ggt	acc	cca	ggc	cga	627
	Ser	Gly	Leu	Arg	Arg	Gly	Ala	His	Ile	Val	Val	Gly	Thr	Pro	Gly	Arg	
			110					115					120				
10	atc	atc	gat	cac	ctc	gaa	aag	ggc	tcc	ctg	gat	atc	tcc	gga	ctg	cgc	675
	Ile	Ile	Asp	His	Leu	Glu	Lys	Gly	Ser	Leu	Asp	Ile	Ser	Gly	Leu	Arg	
			125				130					135					
15	ttc	ctc	gtg	ctc	gat	gaa	gca	gac	gag	atg	ctg	aac	atg	ggc	ttc	cag	723
	Phe	Leu	Val	Leu	Asp	Glu	Ala	Asp	Glu	Met	Leu	Asn	Met	Gly	Phe	Gln	
	140						145				150					155	
20	gaa	gat	gtc	gag	cgc	atc	ctc	gag	gac	acc	cca	gac	gag	aag	cag	gtt	771
	Glu	Asp	Val	Glu	Arg	Ile	Leu	Glu	Asp	Thr	Pro	Asp	Glu	Lys	Gln	Val	
					160					165					170		
25	gca	cta	ttc	tcc	gca	acg	atg	cca	aac	ggc	att	cgt	cgc	ctg	tcc	aag	819
	Ala	Leu	Phe	Ser	Ala	Thr	Met	Pro	Asn	Gly	Ile	Arg	Arg	Leu	Ser	Lys	
				175					180					185			
30	cag	tac	ctg	aac	aac	cct	gct	gaa	atc	acc	gtt	aag	tcc	gag	acc	agg	867
	Gln	Tyr	Leu	Asn	Asn	Pro	Ala	Glu	Ile	Thr	Val	Lys	Ser	Glu	Thr	Arg	
			190					195					200				
35	act	aac	acc	aac	atc	acc	cag	cgc	ttc	ctc	aac	gtt	gca	cac	cgc	aac	915
	Thr	Asn	Thr	Asn	Ile	Thr	Gln	Arg	Phe	Leu	Asn	Val	Ala	His	Arg	Asn	
			205				210					215					
40	aag	atg	gat	gca	ctg	acc	cgt	att	ctc	gag	gtc	acc	gag	ttt	gaa	gca	963
	Lys	Met	Asp	Ala	Leu	Thr	Arg	Ile	Leu	Glu	Val	Thr	Glu	Phe	Glu	Ala	
	220					225					230					235	
45	atg	atc	atg	ttc	gtg	cgc	acc	aag	cac	gaa	act	gaa	gaa	gtt	gct	gaa	1011
	Met	Ile	Met	Phe	Val	Arg	Thr	Lys	His	Glu	Thr	Glu	Glu	Val	Ala	Glu	
					240					245					250		
50	aag	ctc	cgt	gca	cgc	gga	ttc	tcc	gca	gca	gcc	atc	aac	ggc	gac	att	1059
	Lys	Leu	Arg	Ala	Arg	Gly	Phe	Ser	Ala	Ala	Ala	Ile	Asn	Gly	Asp	Ile	
				255					260					265			
55	gct	cag	gca	cag	cgt	gag	cgc	acc	gtc	gac	cag	ctg	aag	gac	ggc	cgc	1107
	Ala	Gln	Ala	Gln	Arg	Glu	Arg	Thr	Val	Asp	Gln	Leu	Lys	Asp	Gly	Arg	
			270					275					280				
60	ctg	gac	atc	ctc	gtt	gca	acc	gac	gtt	gca	gcc	cgt	ggt	ctt	gac	gtt	1155
	Leu	Asp	Ile	Leu	Val	Ala	Thr	Asp	Val	Ala	Ala	Arg	Gly	Leu	Asp	Val	
			285				290					295					
65	gag	cgc	atc	tcc	cac	gtg	ctt	aac	ttc	gac	att	cca	aac	gac	acc	gag	1203
	Glu	Arg	Ile	Ser	His	Val	Leu	Asn	Phe	Asp	Ile	Pro	Asn	Asp	Thr	Glu	
	300					305					310					315	
70	tcc	tac	gtt	cac	cgc	atc	ggc	cgc	acc	ggc	cgt	gca	gga	cgt	acc	ggc	1251
	Ser	Tyr	Val	His	Arg	Ile	Gly	Arg	Thr	Gly	Arg	Ala	Gly	Arg	Thr	Gly	
					320					325					330		

		gag	gca	atc	ctg	ttc	gtg	acc	cca	cgt	gag	cgt	cgt	atg	ctt	cgc	tcc	1299
		Glu	Ala	Ile	Leu	Phe	Val	Thr	Pro	Arg	Glu	Arg	Arg	Met	Leu	Arg	Ser	
					335					340					345			
5		atc	gag	cgc	gca	acc	aac	gca	cca	ctg	cac	gaa	atg	gaa	ctg	cca	acc	1347
		Ile	Glu	Arg	Ala	Thr	Asn	Ala	Pro	Leu	His	Glu	Met	Glu	Leu	Pro	Thr	
				350					355					360				
10		gtc	gat	cag	gtc	aac	gac	ttc	cgc	aag	gtc	aag	ttc	gct	gac	tcc	atc	1395
		Val	Asp	Gln	Val	Asn	Asp	Phe	Arg	Lys	Val	Lys	Phe	Ala	Asp	Ser	Ile	
			365					370					375					
15		acc	aag	tcc	ctc	gag	gac	aag	cag	atg	gac	ctg	ttc	cgc	acc	ctg	gtc	1443
		Thr	Lys	Ser	Leu	Glu	Asp	Lys	Gln	Met	Asp	Leu	Phe	Arg	Thr	Leu	Val	
			380				385					390					395	
20		aag	gaa	tac	tcc	cag	gcc	aac	gac	gtt	cct	cta	gag	gac	atc	gca	gcg	1491
		Lys	Glu	Tyr	Ser	Gln	Ala	Asn	Asp	Val	Pro	Leu	Glu	Asp	Ile	Ala	Ala	
					400						405					410		
25		gca	ctg	gca	acc	cag	gca	cag	tcc	ggc	gac	ttc	ctg	ctc	aag	gag	ctc	1539
		Ala	Leu	Ala	Thr	Gln	Ala	Gln	Ser	Gly	Asp	Phe	Leu	Leu	Lys	Glu	Leu	
					415					420					425			
30		cca	cca	gag	cgc	cgt	gag	cgc	aac	gac	cgc	cgt	cgt	gac	cgt	gac	ttc	1587
		Pro	Pro	Glu	Arg	Arg	Glu	Arg	Asn	Asp	Arg	Arg	Arg	Asp	Arg	Asp	Phe	
				430					435					440				
35		gac	gac	cgt	ggt	gga	cgt	gga	cgc	gac	cgt	gac	cgt	ggc	gac	cgc	gga	1635
		Asp	Asp	Arg	Gly	Gly	Arg	Gly	Arg	Asp	Arg	Asp	Arg	Gly	Asp	Arg	Gly	
			445					450					455					
40		gat	cgt	ggc	tca	cgc	ttc	gac	cgc	gac	gac	gag	aac	ctg	gca	acc	tac	1683
		Asp	Arg	Gly	Ser	Arg	Phe	Asp	Arg	Asp	Asp	Glu	Asn	Leu	Ala	Thr	Tyr	
			460				465					470					475	
45		cgc	ctc	gca	gtg	ggc	aag	cgc	cag	cac	atc	cgc	cca	ggc	gca	atc	gtt	1731
		Arg	Leu	Ala	Val	Gly	Lys	Arg	Gln	His	Ile	Arg	Pro	Gly	Ala	Ile	Val	
					480						485					490		
50		ggt	gca	ctt	gcc	aac	gaa	ggt	ggc	ctg	aac	tcc	aag	gac	ttc	ggc	cgc	1779
		Gly	Ala	Leu	Ala	Asn	Glu	Gly	Gly	Leu	Asn	Ser	Lys	Asp	Phe	Gly	Arg	
					495					500					505			
55		atc	acc	atc	gca	gcc	gac	cac	acc	ctg	gtt	gaa	ctg	cca	aag	gat	ctc	1827
		Ile	Thr	Ile	Ala	Ala	Asp	His	Thr	Leu	Val	Glu	Leu	Pro	Lys	Asp	Leu	
					510				515					520				
60		cca	cag	agc	gtt	ctt	gac	aac	ctg	cgc	gac	acc	cgc	atc	tcc	ggc	cag	1875
		Pro	Gln	Ser	Val	Leu	Asp	Asn	Leu	Arg	Asp	Thr	Arg	Ile	Ser	Gly	Gln	
					525				530				535					
65		ctc	atc	aac	ata	gaa	cgc	gac	tcc	ggt	gga	cgc	cca	cca	cgc	cgc	ttc	1923
		Leu	Ile	Asn	Ile	Glu	Arg	Asp	Ser	Gly	Gly	Arg	Pro	Pro	Arg	Arg	Phe	
							545					550					555	
70		gag	cgc	gat	gac	cgt	ggc	gga	cgc	ggc	gga	ttc	cgc	ggc	gac	cgt	gat	1971
		Glu	Arg	Asp	Asp	Arg	Gly	Gly	Arg	Gly	Gly	Phe	Arg	Gly	Asp	Arg	Asp	
						560				565						570		

gac cgc ggt gga cgt gga cgt gac cgt gac gat cgt gga agc cgt gga 2019  
 Asp Arg Gly Gly Arg Gly Arg Asp Arg Asp Arg Gly Ser Arg Gly  
 575 580 585

5

ggt ttc cgc ggt gga cgt gac cgt gat gat cgt ggc gga cgc ggt gga 2067  
 Gly Phe Arg Gly Gly Arg Asp Arg Asp Arg Gly Gly Arg Gly Gly  
 590 595 600

10

ttc cgc gga cgc gac gac cgc gga gac cgt ggt ggc cgt ggc ggt tac 2115  
 Phe Arg Gly Arg Asp Asp Arg Gly Asp Arg Gly Gly Arg Gly Gly Tyr  
 605 610 615

15

cgt ggc gga cgc gac taagagttcg ttttagcttc agctcagggtt ttcgcctgag 2170  
 Arg Gly Gly Arg Asp  
 620

20

tctggtgctt agctagaaaa atccgttgct ctctctttac tgagagggca acggattttt 2230  
 tctgttttct taggctttgg ttcttggggg atcttggggg aggaattcta ggaacttaga 2290  
 gaagtaaattg atggtgcttc gaccgcagca ccatcgtaa gattctgacc aaagaagaga 2350  
 gcattgcggtt gctctctagt cagagtgcga g 2381

25

<210> 2  
 <211> 624  
 <212> PRT  
 <213> Corynebacterium glutamicum

30

<400> 2  
 Met Pro Glu Arg Val Leu Asp Ala Val Arg Lys Val Gly Tyr Glu Thr  
 1 5 10 15

35

Pro Ser Pro Ile Gln Ala Gln Thr Ile Pro Ile Leu Met Glu Gly Gln  
 20 25 30

40

Asp Val Val Gly Leu Ala Gln Thr Gly Thr Gly Lys Thr Ala Ala Phe  
 35 40 45

Ala Leu Pro Ile Leu Ala Arg Ile Asp Lys Ser Val Arg Ser Pro Gln  
 50 55 60

45

Ala Leu Val Leu Ala Pro Thr Arg Glu Gln Ala Leu Gln Val Ala Asp  
 65 70 75 80

Ser Phe Gln Ser Phe Ala Asp His Val Gly Gly Leu Asn Val Leu Pro  
 85 90 95

50

Ile Tyr Gly Gly Gln Ala Tyr Gly Ile Gln Leu Ser Gly Leu Arg Arg  
 100 105 110

55

Gly Ala His Ile Val Val Gly Thr Pro Gly Arg Ile Ile Asp His Leu  
 115 120 125

Glu Lys Gly Ser Leu Asp Ile Ser Gly Leu Arg Phe Leu Val Leu Asp  
 130 135 140

	Glu	Ala	Asp	Glu	Met	Leu	Asn	Met	Gly	Phe	Gln	Glu	Asp	Val	Glu	Arg	
	145					150					155					160	
5	Ile	Leu	Glu	Asp	Thr	Pro	Asp	Glu	Lys	Gln	Val	Ala	Leu	Phe	Ser	Ala	
					165					170					175		
	Thr	Met	Pro	Asn	Gly	Ile	Arg	Arg	Leu	Ser	Lys	Gln	Tyr	Leu	Asn	Asn	
				180					185					190			
10	Pro	Ala	Glu	Ile	Thr	Val	Lys	Ser	Glu	Thr	Arg	Thr	Asn	Thr	Asn	Ile	
			195					200					205				
	Thr	Gln	Arg	Phe	Leu	Asn	Val	Ala	His	Arg	Asn	Lys	Met	Asp	Ala	Leu	
15		210					215					220					
	Thr	Arg	Ile	Leu	Glu	Val	Thr	Glu	Phe	Glu	Ala	Met	Ile	Met	Phe	Val	
	225					230				235						240	
20	Arg	Thr	Lys	His	Glu	Thr	Glu	Glu	Val	Ala	Glu	Lys	Leu	Arg	Ala	Arg	
					245					250					255		
	Gly	Phe	Ser	Ala	Ala	Ala	Ile	Asn	Gly	Asp	Ile	Ala	Gln	Ala	Gln	Arg	
				260					265					270			
25	Glu	Arg	Thr	Val	Asp	Gln	Leu	Lys	Asp	Gly	Arg	Leu	Asp	Ile	Leu	Val	
			275					280					285				
	Ala	Thr	Asp	Val	Ala	Ala	Arg	Gly	Leu	Asp	Val	Glu	Arg	Ile	Ser	His	
30		290					295					300					
	Val	Leu	Asn	Phe	Asp	Ile	Pro	Asn	Asp	Thr	Glu	Ser	Tyr	Val	His	Arg	
	305					310					315					320	
35	Ile	Gly	Arg	Thr	Gly	Arg	Ala	Gly	Arg	Thr	Gly	Glu	Ala	Ile	Leu	Phe	
					325					330					335		
	Val	Thr	Pro	Arg	Glu	Arg	Arg	Met	Leu	Arg	Ser	Ile	Glu	Arg	Ala	Thr	
				340					345					350			
40	Asn	Ala	Pro	Leu	His	Glu	Met	Glu	Leu	Pro	Thr	Val	Asp	Gln	Val	Asn	
			355					360					365				
	Asp	Phe	Arg	Lys	Val	Lys	Phe	Ala	Asp	Ser	Ile	Thr	Lys	Ser	Leu	Glu	
45		370					375					380					
	Asp	Lys	Gln	Met	Asp	Leu	Phe	Arg	Thr	Leu	Val	Lys	Glu	Tyr	Ser	Gln	
	385					390					395					400	
50	Ala	Asn	Asp	Val	Pro	Leu	Glu	Asp	Ile	Ala	Ala	Ala	Leu	Ala	Thr	Gln	
					405				410						415		
	Ala	Gln	Ser	Gly	Asp	Phe	Leu	Leu	Lys	Glu	Leu	Pro	Pro	Glu	Arg	Arg	
				420					425					430			
55	Glu	Arg	Asn	Asp	Arg	Arg	Arg	Asp	Arg	Asp	Phe	Asp	Asp	Arg	Gly	Gly	
			435					440					445				
	Arg	Gly	Arg	Asp	Arg	Asp	Arg	Gly	Asp	Arg	Gly	Asp	Arg	Gly	Ser	Arg	
	450						455					460					

Phe Asp Arg Asp Asp Glu Asn Leu Ala Thr Tyr Arg Leu Ala Val Gly  
465 470 475 480

5 Lys Arg Gln His Ile Arg Pro Gly Ala Ile Val Gly Ala Leu Ala Asn  
485 490 495

Glu Gly Gly Leu Asn Ser Lys Asp Phe Gly Arg Ile Thr Ile Ala Ala  
500 505 510

10 Asp His Thr Leu Val Glu Leu Pro Lys Asp Leu Pro Gln Ser Val Leu  
515 520 525

15 Asp Asn Leu Arg Asp Thr Arg Ile Ser Gly Gln Leu Ile Asn Ile Glu  
530 535 540

Arg Asp Ser Gly Gly Arg Pro Pro Arg Arg Phe Glu Arg Asp Asp Arg  
545 550 555 560

20 Gly Gly Arg Gly Gly Phe Arg Gly Asp Arg Asp Asp Arg Gly Gly Arg  
565 570 575

Gly Arg Asp Arg Asp Asp Arg Gly Ser Arg Gly Gly Phe Arg Gly Gly  
580 585 590

25 Arg Asp Arg Asp Asp Arg Gly Gly Arg Gly Gly Phe Arg Gly Arg Asp  
595 600 605

30 Asp Arg Gly Asp Arg Gly Gly Arg Gly Gly Tyr Arg Gly Gly Arg Asp  
610 615 620

35

## Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien,  
enthaltend eine für das deaD-Gen kodierende  
5 Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe
  - a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist  
mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid  
kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2  
enthält,
  - 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das  
eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70%  
identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID  
No. 2,
  - c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den  
15 Polynukleotiden von a) oder b), und
  - d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15  
aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz  
von a), b) oder c) ,
- wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität der DNA/RNA-  
20 Helikase aufweist.
2. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid  
eine in coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt  
rekombinante DNA ist.
3. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid  
25 eine RNA ist.
4. Polynukleotid gemäß Anspruch 2, enthaltend die  
Nukleinsäuresequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt.
5. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2, enthaltend
  - (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder

- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz  
(i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des  
genetischen Kodes entspricht, oder
- (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz  
5 (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert,  
und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).
6. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 5, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß die Hybridisierung  
10 unter einer Stringenz entsprechend höchstens 2x SSC  
durchgeführt wird.
7. Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 1, die für ein  
Polypeptid kodiert, das die in SEQ ID No. 2  
dargestellte Aminosäuresequenz enthält.
- 15 8. Coryneforme Bakterien, in denen das deaD-Gen  
abgeschwächt, insbesondere ausgeschaltet wird.
9. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-  
Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß man folgende Schritte  
20 durchführt:
- a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure  
produzierenden coryneformen Bakterien, in denen man  
zumindest das deaD-Gen oder dafür kodierende  
Nukleotidsequenzen abschwächt, insbesondere  
25 ausschaltet;
- b) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium oder in den  
Zellen der Bakterien, und
- c) Isolieren der L-Aminosäure.
10. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h  
30 g e k e n n z e i c h n e t, daß man Bakterien

einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure verstärkt.

11. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h  
5 g e k e n n z e i c h n e t, daß man Bakterien einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der gewünschten L-Aminosäure verringern.
12. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h  
10 g e k e n n z e i c h n e t, daß man die Expression des (der) Polynukleotides (e), das (die) für das deaD-Gen kodiert (kodieren) abschwächt, insbesondere ausschaltet.
13. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h  
15 g e k e n n z e i c h n e t, daß man die katalytischen Eigenschaften des Polypeptids (Enzymprotein) verringert, für das das Polynukleotid deaD kodiert.
14. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h  
20 g e k e n n z e i c h n e t, daß man zur Herstellung von L-Aminosäuren coryneforme Mikroorganismen fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
- 14.1 das für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende Gen dapA,
- 25 14.2 das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase kodierende Gen gap,
- 14.3 das für die Triosephosphat-Isomerase kodierende Gen tpi,
- 14.4 das für die 3-Phosphoglycerat-Kinase kodierende  
30 Gen pgk,



- 14.5 das für die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase kodierende Gen zwf,
- 14.6 das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende Gen pyc,
- 5 14.7 das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase kodierende Gen mqo,
- 14.8 das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC,
- 14.9 das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE,
- 10 14.10 das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende Gen hom,
- 14.11 das für die Threonin-Dehydratase kodierende Gen ilvA oder das für eine feed back resistente Threonin-Dehydratase kodierende Allel ilvA(Fbr),
- 15 14.12 das für die Acetohydroxysäure-Synthase kodierende Gen ilvBN,
- 14.13 das für die Dihydroxysäuredehydratase kodierende Gen ilvD,
- 20 14.14 das für das Zwa1-Protein kodierende Gen zwal
- verstärkt bzw. überexprimiert.
15. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man zur Herstellung von L-Aminosäuren coryneforme Mikroorganismen fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
- 25 15.1 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen pck,

- 15.2 das für die Glucose-6-Phosphat-Isomerase  
kodierende Gen *pgi*,
- 15.3 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen *poxB*
- 15.4 das für das Zwa2-Protein kodierende Gen *zwa2*
- 5 abschwächt.
16. Coryneforme Bakterien, die einen Vektor enthalten, der  
Teile des Polynukleotids gemäß Anspruch 1, mindestens  
aber 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der  
beanspruchten Sequenz, trägt.
- 10 17. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden  
Ansprüche, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß man Mikroorganismen der Art *Corynebacterium*  
*glutamicum* einsetzt.
- 15 18. Verfahren zum Auffinden von RNA, cDNA und DNA, um  
Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder Gene  
zu isolieren, die für die DNA/RNA-Helikase kodieren  
oder eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des *dead*-  
Gens aufweisen, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n  
e t,
- 20 daß man das Polynukleotid, enthaltend die  
Polynukleotidsequenzen gemäß den Ansprüchen 1, 2, 3  
oder 4, als Hybridisierungssonden einsetzt.

**Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft ein isoliertes Polynukleotid enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- 15 d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

20 und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen zumindest das dead-Gen abgeschwächt vorliegt, und die Verwendung von Polynukleotiden, die die erfindungsgemäßen Sequenzen enthalten, als Hybridisierungssonden.